

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020624 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, A61K 39/395, A61P 35/00, C07K 14/82, 16/32, C12N 5/06, G01N 33/53, 33/574
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011049
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 29 日 (29.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-255668 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP
特願 2002-341168
2002 年 11 月 25 日 (25.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人くまもとテクノ産業財団 (KUMAMOTO TECHNOLOGY & INDUSTRY FOUNDATION) [JP/JP]; 〒861-2202 熊本県上益城郡益城町大字田原 2 0 8 1 番地 1 0 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中面 哲也 (NAKATSURA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒861-1115 熊本県菊池郡合志町豊岡 2 5 2 7 - 4 6 4 Kumamoto (JP). 西村 泰治 (NISHIMURA, Yasuharu) [JP/JP]; 〒862-0937 熊本県熊本市長嶺西 2 丁目 9 - 5 2 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CANCER ANTIGENS AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 癌抗原及びその利用

(57) Abstract: It is intended to provide human pancreatic cancer and colon cancer antigens which are applicable to the diagnosis and treatment of various cancers such as pancreatic cancer and colon cancer and tumors, genes encoding the same, anticancer vaccines using the same, etc. Namely, a cancer antigen comprising a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; a peptide comprising a part of the above protein and having an immune inducing activity; an anticancer vaccine containing the peptide; a DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:2, a sequence complementary to it, or the full-length of such a sequence or a part thereof; an anticancer vaccine containing the DNA; and utilization of the same.

(57) 要約: 本発明の目的は、膵癌・大腸癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膵癌・大腸癌抗原や、それをコードする遺伝子、それを用いた抗癌ワクチン等を提供することである。本発明によれば、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白からなる癌抗原; 上記の蛋白の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド; 該ペプチドを含む抗癌ワクチン; 配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA; 該 DNA を含む抗癌ワクチン; 並びにこれらの利用が提供される。

WO 2004/020624 A1

明細書

癌抗原及びその利用

技術分野

本発明は、膀胱癌又は大腸癌等の各種癌の診断や免疫療法などに有用な新規なヒト癌抗原、及びその利用等に関する。

背景技術

現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌を治療できないのが現状である。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。

癌の治療法として免疫療法は古くから期待され、様々な試みがなされてきたが、まだ十分な抗腫瘍効果を示すには至っていない。従来、癌の免疫療法は非特異的免疫療法を中心として行われてきたが、近年、T細胞が生体内での腫瘍拒絶に重要な役割を果たすことが明らかになり、細胞傷害性T細胞（CTL：cytotoxic T lymphocyte）を誘導しうるT細胞認識腫瘍抗原の単離とMHCクラスI拘束性エピトープの決定に努力がそそがれている。

従来、多くの腫瘍抗原の単離としてCTLを用いたcDNA発現クローニング法で行われてきたが、腫瘍の細胞株化とCTLの樹立が必要であることから、メラノーマ以外の癌腫からの腫瘍抗原の単離は困難である。また、免疫治療法の効果を上げるために、多くのペプチドをミックスした治療法が有効と考えられているが、それを確立するためには、数多くの抗原の単離が必要であり、従来のcDNA発現クローニング法は、1つの抗原の単離に多くの労力と時間を費やすという問題があった。

1995年にドイツのPfreundschuhや米国のOldらのグループにより、癌患者血清中の抗体が認識する癌抗原タンパクを検出するSEREX法（serological

identification of recombinant cDNA expression cloning; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11810-11813, 1995) が報告されている。この方法によって多くの腫瘍抗原が単離されているが、本方法を用いて単離された抗原の中にはCTLを誘導するMAGE-1やチロシナーゼなどの抗原がみられることから、細胞性免疫が認識する抗原を検出する方法としても有用であることが指摘されている。また、上記方法を用いて患者IgG抗体が認識する癌抗原を単離した報告もなされている (Int. J. Cancer 72, 965-971, 1997、Cancer Res. 58, 1034-1041, 1998、Int. J. Cancer 29, 652-658, 1998、Int. J. Oncol. 14, 703-708, 1999、Cancer Res. 56, 4766-4772, 1996、Hum. Mol. Genet 6, 33-39, 1997)。

発明の開示

本発明の課題は、膵癌・大腸癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膵癌・大腸癌抗原や、それをコードする遺伝子、それを用いた抗癌ワクチン等を提供することにある。

すなわち本発明によれば、下記(A)又は(B)の何れかの蛋白質から成る癌抗原が提供される。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質。

本発明の別の側面によれば、上記した本発明の癌抗原を含む、癌に対する免疫誘導剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の癌抗原の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドが提供される。本発明のペプチドは、好ましくは、癌抗原蛋白質を認識する細胞傷害性T細胞を活性化しうるペプチドである。本発明のペプチドは、好ましくは、配列番号3～22の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドである。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 3 ～ 22 の何れかに記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有するペプチドが提供される。上記のペプチドは、好ましくは、癌抗原蛋白質を認識する細胞傷害性 T 細胞を活性化しうるペプチドである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の何れかのペプチドを含む、癌に対する免疫誘導剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の本発明の癌抗原をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記 (a)、(b) 又は (c) の何れかの DNA が提供される。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(c) 上記 (a) 又は (b) の DNA の部分配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードする DNA。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の本発明の癌抗原又はペプチドに対する抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の本発明の癌抗原、又はペプチド、又はそれらの混合物を用いてインビトロ刺激により誘導されたヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の本発明の癌抗原、又はペプチド、又はそれらの混合物と、免疫賦活剤とを用いてインビトロ刺激により誘導されたヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団が提供される。好ましくは、免疫賦活剤は細胞増殖因子又はサイトカインである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を体内に移入することを含む、腫瘍を抑制する方

法が提供される。上記方法は、好ましくは、癌を予防及び／又は治療するために行うことができる。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の癌抗原、又はペプチド、又はそれらの混合物を含む、本発明のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製するための細胞培養液が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の細胞培養液、及び細胞培養容器を含む、本発明のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製するための細胞培養キットが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の癌抗原及び／又は少なくとも1種類以上のペプチドを含む癌ワクチンが提供される。上記癌ワクチンは、好ましくは、アジュバンドをさらに含む。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のDNA、又は該DNAを含む組換えウイルス若しくは組換え細菌を含む、癌ワクチンが提供される。上記癌ワクチンは、好ましくは、アジュバンドをさらに含む。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のDNAを含む、癌診断用プローブが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の癌診断用プローブ及び／又は抗体を含む、癌診断薬が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の癌抗原、ペプチド、抗体、及び／又はヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を含む、癌の予防・治療薬が提供される。

本発明において好ましくは、癌は膀胱癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、膀胱癌又は肉腫である。

図面の簡単な説明

図1は膵癌におけるh s p 1 0 5の免疫組織化学的解析結果を示した顕微鏡写真である。

A：膵癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色、CA：癌部、NP：非癌部を示す。

B：癌細胞にh s p 1 0 5蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C：非癌部の強拡大。細胞質に弱いh s p 1 0 5蛋白の発現を認める。

D：癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質にh s p 1 0 5蛋白の高発現を認める。

図2は大腸癌におけるh s p 1 0 5の免疫組織化学的解析結果を示した顕微鏡写真である。

A：大腸癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色、CA：癌部、NP：非癌部を示す。

B：癌細胞にh s p 1 0 5蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C：非癌部の強拡大。細胞質に弱いh s p 1 0 5蛋白の発現を認める。

D：癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質にh s p 1 0 5蛋白の高発現を認める。核にも弱い発現を認める。

図3はマウス大腸癌細胞Colon-26に対するh s p 1 0 5のDNAワクチン、およびh s p 1 0 5ペプチドワクチン、及び対照品の抗癌効果を示したグラフである。Aは癌部の面積を、Bは癌が生着したマウスの割合、Cは生存マウスの割合を示す。

図4はh s p 1 0 5蛋白由来の各種ペプチドワクチンまたはh s p 1 0 5蛋白をコードするDNAワクチンのColon-26に対する細胞傷害活性を⁵¹Cr release assayにより測定した結果を示すグラフである。

図5は、組織におけるhsp105の免疫組織化学的解析の結果を示す。

図6は、hsp105で誘導したマウスのCD4陽性ヘルパーT細胞株のin vivoにおける抗腫瘍活性を解析した結果を示す。

図7は、大腸癌患者のCD4陽性ヘルパーT細胞株をhsp105で誘導した結果を示す。

図 8 は、hsp105 由来ペプチドで誘導した BALB/c マウスの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、hsp105 を高発現する大腸癌細胞株 Colon26 腫瘍塊を縮小させるかどうかを調べた結果を示す。

図 9 は、hsp105 由来ペプチドで誘導した大腸癌患者の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、hsp105 を高発現する大腸癌細胞株 sw620 腫瘍塊を縮小させるかどうかを調べた結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳しく説明する。

(1) 本発明の癌抗原、ペプチド及び癌に対する免疫誘導剤

本発明の膀胱癌・大腸癌から採取された癌抗原は、下記 (A) 又は (B) の何れかの蛋白質である。

(A) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質 (以下「h s p 1 0 5」とも言う)。

(B) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質。

本明細書で言う免疫誘導活性を有する蛋白質とは、抗体産生、細胞性免疫等の免疫反応を誘導する活性を有する蛋白質を言うが、なかでも、細胞傷害性 T 細胞 (キラー T 細胞 / CTL) を刺激する T 細胞誘導活性を有する蛋白質が特に好ましい。

h s p 1 0 5 は h s p 1 1 0 / 1 0 5 ファミリーに属する高分子量の熱ショック蛋白で、h s p 1 0 5 α と 1 0 5 β からなっている。1 0 5 α は 1 0 5 k D a の熱ショック蛋白で、様々なストレスで誘導される。1 0 5 β は 1 0 5 α の m R N A がスプライシングにより産生される 1 0 5 α より分子量の小さい蛋白である。本発明の膀胱癌・大腸癌抗原である h s p 1 0 5 は例えば、本明細書の下記実施例のような S E R E X 法で検出することができる。

本発明において「配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列」における「1 若しくは数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 20 個、好ましくは 1 から 10 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

本発明の癌抗原蛋白質の入手・製造方法は特に限定されず、天然由来の蛋白質でも、化学合成した蛋白質でも、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質の何れでもよい。比較的容易な操作でかつ大量に製造できるという点では、組み換え蛋白質が好ましい。

天然由来の蛋白質を入手する場合には、該蛋白質を発現している細胞又は組織から蛋白質の単離・精製方法を適宜組み合わせて単離することができる。化学合成蛋白質を入手する場合には、例えば、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って本発明の蛋白質を合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明の蛋白質を合成することもできる。

本発明の癌抗原蛋白質を組み換え蛋白質として産生するには、該蛋白質をコードする塩基配列(例えば、配列番号 2 に記載の塩基配列)を有する DNA 又はその変異体又は相同体入手し、これを好適な発現系に導入することにより本発明の癌抗原を製造することができる。

発現ベクターとしては、好ましくは宿主細胞において自立複製可能であるか、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものであればよく、本発明の遺伝子を発現できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。また、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を有する形質転換体は、上記の発現ベクターを宿主に導入することにより作製することができる。宿主は、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞のいずれでもよく、また宿主への発現ベクターの導入は、各宿主に応じた公知の手法により行えばよい。

本発明においては、上記のようにして作製した本発明の遺伝子を有する形質転

換体を培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より本発明の蛋白質を採取することにより組み換え蛋白質を単離することができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。また培養条件も該微生物を培養するのに通常用いられる条件にて行えばよい。培養後、形質転換体の培養物から本発明の蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

なお、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有する蛋白質は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA 配列の一例示す配列番号 2 に記載の塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜製造又は入手することができる。

即ち、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子（変異遺伝子）は、化学合成、遺伝子工学的手法又は突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することもできる。具体的には、配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA を利用し、これら DNA に変異を導入することにより変異 DNA を取得することができる。

例えば、配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA に対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989（以下、モレキュラークロニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオ

ロジーと略す) 等に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明はさらに、上記した本発明の蛋白質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドにも関する。本発明のペプチドは、癌抗原蛋白質を認識する細胞傷害性T細胞を活性化しうるものが好ましい。このようなペプチドの具体例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

Asn-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu	(配列番号 3)
Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu	(配列番号 4)
Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile	(配列番号 5)
Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu	(配列番号 6)
Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile	(配列番号 7)
Thr-Phe-Leu-Arg-Arg-Gly-Pro-Phe-Glu-Leu	(配列番号 8)
Glu-Tyr-Val-Tyr-Glu-Phe-Arg-Asp-Lys-Leu	(配列番号 9)
His-Tyr-Ala-Lys-Ile-Ala-Ala-Asp-Phe	(配列番号 10)
Lys-Tyr-Asn-His-Ile-Asp-Glu-Ser-Glu-Met	(配列番号 11)
Ser-Leu-Asp-Glu-Lys-Pro-Arg-Ile-Val-Val	(配列番号 12)
Arg-Leu-Tyr-Gln-Glu-Cys-Glu-Lys-Leu	(配列番号 13)
Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Asn-Ser-Thr-Asp-Leu	(配列番号 14)
Leu-Met-Ser-Ser-Asn-Ser-Thr-Asp-Leu	(配列番号 15)
Ser-Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu	(配列番号 16)
Lys-Ile-Gly-Arg-Phe-Val-Val-Gln-Asn-Val	(配列番号 17)
Tyr-Val-Tyr-Glu-Phe-Arg-Asp-Lys-Leu	(配列番号 18)
Leu-Leu-Thr-Glu-Thr-Glu-Asp-Trp-Leu	(配列番号 19)
Trp-Leu-Tyr-Glu-Glu-Gly-Glu-Asp-Gln-Ala	(配列番号 20)
Glu-Leu-Met-Lys-Ile-Gly-Thr-Pro-Val	(配列番号 21)
Val-Met-Asn-Ala-Gln-Ala-Lys-Lys-Ser-Leu	(配列番号 22)

さらに、上記の配列番号 3～22 の何れかに記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列

を有し、かつ、免疫誘導活性を有するペプチドも本発明の範囲内である。このようなペプチドの好ましい例としては、癌抗原蛋白質を認識する細胞傷害性T細胞を活性化しうるペプチドが挙げられる。

本発明において、「配列番号3～22の何れかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列」における「1若しくは数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から5個、好ましくは1から4個、より好ましくは1から3個、さらに好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個を意味する。

本発明のペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明のペプチドを合成することもできる。

上記した本発明の癌抗原蛋白質及びペプチドは、後記実施例にも示す通り、癌に対する免疫を誘導することができる。従って、本発明によれば、本発明の癌抗原蛋白質又はペプチドを含む、癌に対する免疫誘導剤が提供される。

本発明の癌に対する免疫誘導剤は、インビトロ又はインビボ、好ましくはインビトロで用いることにより、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を誘導することができ、これにより癌に対する免疫を付与することができる。

(2) 本発明のDNA

本発明のDNAは、上記(1)に記載した本発明の癌抗原蛋白質をコードするDNAであり、好ましくは、下記(a)、(b)又は(c)の何れかのDNAである。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(c) 上記 (a) 又は (b) の DNA の部分配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードする DNA。

上記した「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、DNA をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA の塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはブラーク由来の DNA 又は該 DNA の断片を固定化したフィルターを用いて、0.7 ~ 1.0 M の NaCl 存在下、65℃ でハイブリダイゼーションを行った後、0.1 ~ 2 × SSC 溶液 (1 × SSC 溶液は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウム) を用い、65℃ 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA 等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラークロニング第 2 版等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA としては、プローブとして使用する DNA の塩基配列と一定以上の相同性を有する DNA が挙げられ、例えば 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 93% 以上、特に好ましくは 95% 以上、最も好ましくは 98% 以上の相同性を有する DNA が挙げられる。

本発明の DNA の取得方法は特に限定されない。本明細書中の配列表の配列番号 1 および配列番号 2 に記載したアミノ酸配列及び塩基配列の情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いてヒトなどの cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより本発明の DNA を単離することができる。cDNA ライブラリーは、本発明の DNA を発現している細胞、器官又は組織から作製することが好ましい。

PCR 法により配列番号 2 に記載した塩基配列を有する DNA を取得することもできる。ヒト染色体 DNA 又は cDNA ライブラリーを鋳型として使用し、配列番号 2 に記載した塩基配列を増幅できるように設計した 1 対のプライマーを用

いてPCRを行う。PCRの反応条件は適宜設定することができ、例えば、94℃で30秒間（変性）、55℃で30秒～1分間（アニーリング）、72℃で2分間（伸長）からなる反応工程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができる。次いで、増幅されたDNA断片を、大腸菌等の宿主で増幅可能な適切なベクター中にクローニングすることができる。

上記したプローブ又はプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、並びに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、モレキュラークローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法に準じて行うことができる。

(3) 本発明の抗体

本発明は、上記した本発明の蛋白質またはペプチドの一部もしくは全部をエピトープ（抗原）として認識する抗体、並びに該蛋白質又はペプチドを用いてインビトロ刺激により誘導された細胞傷害性（キラー）T細胞（CTL）にも関する。一般的には、CTLのほうが抗体よりも強い抗腫瘍活性を示す。

本発明の抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、その作製は定法により行なうことができる。

例えば、ポリクローナル抗体は、本発明の蛋白質を抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を、例えば7～30日間隔で2～3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05～2mg程度とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹腔腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができる。

また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント又は水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができる。

免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、抗体価が上昇してきたら、例えば $100\mu\text{g} \sim 1000\mu\text{g}$ の抗原を用いて追加免疫を行なうことができる。最後の投与から1～2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウム又はポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の常法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、本発明の蛋白質を認識するポリクローナル抗体を得ることができる。

一方、モノクローナル抗体はハイブリドーマを調製して得ることができる。例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマを得ることができる。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、本発明の蛋白質又はその部分ペプチドを使用する。免疫動物としてはマウス、ラット等を使用でき、これらの動物への抗原の投与は常法により行う。例えば完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントなどのアジュバントと抗原である本発明の蛋白質との懸濁液もしくは乳化液を動物の静脈、皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とを公知の方法 (G. Kohler et al., Nature, 256 495 (1975)) により融合してハイブリドーマを作製することができる。

細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスではP3X63Ag8、P3U1株、Sp2/0株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細

胞融合後のハイブリドーマの選択にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）培地を常法に従って使用する。細胞融合により得られるハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングする。さらに必要に応じて、本発明の蛋白質を用いた酵素免疫測定法によりスクリーニングを行うことにより、本発明の蛋白質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。

このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせ使用できる。

また、上記した抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、F（a b'）2フラグメント、F a b' フラグメント等が挙げられる。

さらに、上記した抗体の標識抗体も本発明の範囲内である。即ち、上記のようにして作製した本発明の抗体は標識して使用することができる。抗体の標識の種類及び標識方法は当業者に公知である。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどの酵素標識、F I T C（フルオレセインイソチオシアネート）又はT R I T C（テトラメチルローダミンBイソチオシアネート）等の蛍光標識、コロイド金属および着色ラテックスなどの呈色物質による標識、ビオチンなどのアフィニティー標識、あるいは¹²⁵Iなどの同位体標識などを挙げることができる。本発明の標識抗体を用いた本発明の蛋白質（即ち、癌抗原）の分析又は測定は、酵素抗体法、免疫組織染色法、免疫ブロット法、直接蛍光抗体法又は間接蛍光抗体法等の当業者に周知の方法に従って行うことができる。

（４）ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団

本発明はまた、本発明の癌抗原、ペプチド、又はそれらの混合物を用いてイン

ビトロ刺激により誘導されたヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団に関する。例えば、末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球を本発明の蛋白質又はペプチドでインビトロ刺激すると腫瘍反応性活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞は養子免疫療法に有効に用いることができる。また本発明の癌抗原又はペプチドを強力な抗原提示細胞である樹状細胞にインビボあるいはインビトロで発現させて、その抗原発現樹状細胞投与により免疫誘導を行うことができる。

好ましくは、本発明の癌抗原、ペプチド又はそれらの混合物と、免疫賦活剤とを用いてインビトロ刺激により、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を誘導することができる。ここで用いる免疫賦活剤としては細胞増殖因子又はサイトカインなどが挙げられる。

上記のようにして得られたヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を体内に移入することにより、腫瘍を抑制することができ、癌を予防及び／又は治療することが可能である。

また、本発明の癌抗原又はペプチド、又はそれらの混合物を用いることにより、上記した通り腫瘍を抑制することができるヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製することができる。従って、本発明によれば、本発明の癌抗原又はペプチド、又はそれらの混合物を含む細胞培養液が提供される。この細胞培養液を用いることにより、腫瘍を抑制することができるヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製することができる。さらに、本発明によれば、上記の細胞培養液、及び細胞培養容器を含む、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製するための細胞培養キットも提供される。

(5) 本発明の癌ワクチン

本発明のDNA、癌抗原及びペプチドは、癌細胞特異的細胞傷害性T細胞を誘導することができるので、癌の治療、予防剤として期待できる。例えば、本発明

のDNAを適当なベクターに組み込み、この組換えDNAで形質転換されたBCG菌の細菌、または本発明のDNAをゲノムに組み込まれたワクシニアウイルス等のウイルスは、ヒト癌の治療・予防用生ワクチンとして有効に利用できる。なお、癌ワクチンの投与量及び投与法は通常の種痘やBCGワクチンと同様である。

即ち、本発明のDNA（そのまま、あるいは発現ベクターに組み込んだプラスミドDNAの形）、該DNAを含む組換えウイルス若しくは組換え細菌はそのままあるいはアジュバントに分散した状態で癌ワクチンとしてヒトを含む哺乳動物に投与することができる。本発明のペプチドも同様にアジュバンドと分散した状態で癌ワクチンとして投与することができる。

本発明で用いることができるアジュバントとしては、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート（TDM）、リポ多糖（LPS）、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、フロイントの不完全アジュバント（FIA）を使用することが好ましい。

（６）本発明の癌診断用プローブ、癌診断薬、癌の予防・治療薬

本発明のDNAは各種ヒト癌のDNAを取り出してその相同性を調べることで診断用プローブとして使用することができる。また、このプローブや前記抗体を使用して癌診断薬として使用することができる。

即ち、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を含む癌診断用プローブに関する。さらに本発明は、上記の癌診断用プローブ又は本発明の蛋白質に対する抗体を含む、癌診断薬に関する。本発明の癌診断用プローブとしては、本発明の蛋白質をコードするDNA（cDNA）又はRNA（cRNA）のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ（少なくとも20ベース以上）を有するものが好ましい。例えば、上記アンチセンス鎖を用いて検体から得られた本発明の蛋白質（癌抗原）のmRNAを検出することにより、癌の診断が可能となる。検出に用いら

れる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを挙げることができるがこれらに限定されるものではない。かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いてもよい。

本明細書で言う癌の種類は特に限定されず、具体例としては、膵癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、膀胱癌又は肉腫などが挙げられる。

癌患者の癌細胞に対する免疫応答は予想以上に活発であり、多種多様な蛋白に対してIgG抗体が産生されていることを見出している。本発明の抗原蛋白であるhsp105は後述の実施例に示すように膵癌、大腸癌、乳癌、食道癌、悪性リンパ腫、褐色細胞腫、甲状腺癌、膀胱癌、精上皮腫で特異的に高発現する。

本発明の蛋白質又はペプチドは、T細胞エピトープとして癌細胞特異的細胞傷害性T細胞を誘導することができるので、ヒト癌の予防・治療剤として有用である。また、本発明の抗体も、癌抗原である本発明の蛋白質の活性を阻害することができるものであれば、ヒト癌の予防・治療剤として有用である。実際の使用法としては、本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体をそのまま、又は医薬的に許容される担体及び／又は希釈剤とともに、必要に応じて下記の補助剤も加えて、注射剤として投与することもできるし、噴霧などの方法で粘膜からの経皮吸収などで投与してもよい。尚、ここで言う担体とは例えば、ヒト血清アルブミンであり、また希釈剤としては、例えばPBS、蒸留水等を挙げることができる。

投与量は成人1人当たり、本発明の癌抗原、ペプチド又は抗体を例えば、1回当たり0.01mg～100mgの範囲になるように投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。製剤の形態も特に限定されず、凍結乾燥したものや、糖などの賦形剤を加えて顆粒にしたものでもよい。

本発明の薬剤に添加することができる細胞傷害性T細胞誘導活性を高めるための補助剤としては、BCG菌などの菌体成分、Nature, vol. 344, p873 (1990)

に記載される ISCOM、J. Immunol. vol. 148, p1438 (1992) に記載されるサポニン系の QS-21、リポソーム、水酸化アルミニウムなどが挙げられる。また、レンチナン、シゾフィラン、ピシバーニールなどの免疫賦活剤を補助剤として用いることもできる。また、IL-2、IL-4、IL-12、IL-1、IL-6、TNF などの T 細胞の増殖、分化を増強するサイトカイン等も補助剤として用いることができる。

また、患者から採取した細胞または、同一の HLA パプロタイプを持つ細胞に試験管内で当該抗原ペプチドを加え、抗原提示させた後、患者血管内に投与し、患者体内で効果的に細胞傷害性 T 細胞を誘導することもできる。また、患者末梢血リンパ球に当該ペプチドを加えて試験管内で培養することにより試験管内で細胞傷害性 T 細胞を誘導した後に患者血管内に戻すこともできる。このような細胞移入による治療は既に癌治療法として実施されており、当業者間ではよく知られた方法である。

特異的抗腫瘍免疫療法の標的抗原となるものは、その抗原が細胞傷害性 T 細胞（キラー T 細胞 / CTL）の認識抗原であることが必要である。本発明の抗原は日本人に多い HLA-A24 あるいは世界的に多い HLA-A2 において、インビトロにおけるキラー T 細胞誘導活性を増大させた。このことから本発明の抗原を体内に注入することにより、CTL を誘導活性化し、その結果、抗腫瘍効果が期待できる。また、リンパ球をインビトロで本発明の抗原で刺激すると活性化 T 細胞が誘導され、この活性化された T 細胞を患部に注入することによる養子免疫療法に有効に用いることができる。

実施例

次に本発明の抗原、その製造方法、効果について実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら制約されるものではない。

実施例 1

《血清の採取》

膀胱癌患者から血清を採取した。採血後の血清は -80°C で保存した。この血清サンプルから、大腸菌とファージの溶解物とセファロース 4B が充填されたカラムを用いて大腸菌と λ ファージに対する抗体を除去した後、 $100\sim 800$ 倍に希釈し、使用した。

《cDNAライブラリー／蛋白の作製》

Stratagene、La Jolla、CA より膀胱癌細胞株 CFPAC-1 の cDNA を λ ZAP エクスプレスベクターに挿入してあるファージ cDNA ライブラリーを購入した。この・ファージ cDNA ライブラリーを大腸菌に感染させた後、NZY プレート培地上で 42°C 、6 時間培養し溶菌斑（プラーク）を作らせた。isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) を浸透させたニトロセルロースメンブレンでプレートを 37°C で 3 時間覆うことにより、プラーク中で λ ファージに組み込んだ cDNA がコードする蛋白を作らせた。

《イムノスクリーニング》

上記方法で産生した蛋白をニトロセルロースメンブレンに転写した。ブロッキング後のニトロセルロースを洗浄し、前記血清と 4°C で 15 時間反応させた。洗浄後 2 次抗体として Horseradish Peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒト IgG 抗体をメンブレンと反応させた。洗浄した後に、化学発光を X 線フィルム上で検出し、写真のプレートと照らし合わせ、陽性プラークを周囲の陰性プラークとともにピックアップした。発色反応陽性部位に一致するプラークを 15 cm NZY アガロースプレート上から採取し、SM 緩衝液 (100 mM の NaCl、 10 mM の MgSO_4 、 50 mM の Tris-HCl、 0.01% のゼラチン； $\text{pH } 7.5$) に溶解させた。発色反応陽性プラークが単一化するまで上記と同様の方法で 2 次、3 次スクリーニングを繰り返し、血清中の IgG 抗体が反応する単一のファージクローンを得た。以上の方法により膀胱癌細胞株由来の cDNA から 63 個の陽性クローンを単離した。

《単離抗原遺伝子の相同性検索》

P C R法によりインサートDNAを増幅し、以後の解析に用いた。得られたP C R産物を Big Dye DNA シーケンシングキット (PE Biosystems, CA) Aシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。上記決定された63種類の遺伝子の塩基配列を、それぞれ相同性検索プログラムB L A S T (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて、N C B I データバンクに登録されている遺伝子情報と比較した。

《h s p 1 0 5》

その結果、表1の18個の陽性クローンを認めた。その1個がh s p 1 0 5であった。

表 1

膵管腺癌細胞株の SEREX により単離された遺伝子

遺伝子名	遺伝子/配列同一性	SEREX データベースサーチ a
KM-PA-1	apg-2 (heat shock protein 110 family)	NGO-St-81, NY-CO-40, NY-CO-32
KM-PA-2	EST (KIAA0124)	—
KM-PA-3	β -actin	—
KM-PA-4	coactosin-like protein (CLP)	—
KM-PA-5	HALPHA44 (alpha-tubulin)	—
KM-PA-6	unknown	—
KM-PA-7	CDC-like kinase (CLK3)	—
KM-PA-8	cytokeratin 18	—
KM-PA-9	polyA binding protein	—
KM-PA-10	very-long-chain-acyl-CoA-dehydrogenase (VLCAD)	—
KM-PA-11	unknown	—
KM-PA-12	HLA-Cw heavy chain (MHC Class I)	LONY-BR-26
KM-PA-13	unknown	—
KM-PA-14	CGI 55 protein	—
KM-PA-15	glycosylation-inhibiting factor (GIF)	Mz19-16a, Hom-HD1-21
KM-PA-16	unknown	NGO-St-95, NGO-St-103
KM-PA-17	DNA binding protein A (dbpA)	—
KM-PA-18	heat shock protein 105 (KIAA0201)	NY-CO-25

a : 横線は強いホモロジーがないことを示す。

《h s p 1 0 5 発現の確認》

各種癌組織および正常組織における、h s p 1 0 5 蛋白の発現の有無を免疫組織化学的に解析した。その結果、図 1 および図 2 に示したように h s p 1 0 5 は肺癌組織及び大腸癌組織に発現することがわかった。

実施例 2

《h s p 1 0 5 を構成するペプチド》

日本人の 60% が陽性の H L A - A 2 4 に結合するモチーフと B A L B / c マウスの K^d の結合するモチーフはほとんど同じである。H L A - peptide binding prediction (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) を用いて H L A - A 2 4 と K^d の両方に結合すると予測されるヒト・マウス h s p 1 0 5 共通のペプチドを h s p 1 0 5 のシークエンスより選び出し、9 または 10 のアミノ酸からなる 9 種類のペプチドを Fmoc/PyBOP 法で合成した。ペプチドのシークエンスと K^d への結合予測値を表 2 に示す。

表 2

hsp105由来ペプチド

hsp105-derived peptides			
No.	Position	Sequence	Binding Score
1	hsp105 180-188	NYGIYKQDL	2400
2	hsp105 214-223	AFNKGKLV	960
3	hsp105 251-260	KYKLDKSKI	2880
4	hsp105 305-313	QFEELCAEL	1382
5	hsp105 433-442	TFLRRGPFEL	1920
6	hsp105 570-579	MYIETEGKMI	4800
7	hsp105 597-606	ECVYEFKDL	80
8	hsp105 682-690	HYAKIAADF	60
9	hsp105 696-705	KYNHIDESEM	432

実施例 3

《DNAワクチン》

マウス h s p 1 0 5 c DNA を発現ベクター p C A G G S に組み込んだプラスミド DNA をそのまま適当な濃度に調整してワクチンとして以下の性能評価試験に使用した。なお、このマウス h s p 1 0 5 - p C A G G S DNA ワクチンは大腸菌を培養し、その後大腸菌からプラスミド DNA を取り出し、精製することにより大量に産生したものをを用いた。

《ペプチドワクチンおよび DNA ワクチンの抗癌効果》

B A L B / c マウスの筋肉に①生理食塩水、②ベクターのみ、③ h s p 1 0 5 c DNA ベクター、④アジュバントのみ、及び⑤アジュバント+ペプチドを注射し、同系マウス由来の h s p 1 0 5 を高発現する大腸癌細胞株 Colon-26 を背部皮下に移植して、マウスの癌の発症を（１）癌部の面積、（２）癌が生着したマウスの割合、（３）生存マウスの割合で評価した。結果を図 3 A、B、C に示す。

図 3 A、B、C に示すように、 3×10^4 個の Colon26 を植えた場合、生食のみあるいは、pCAGGS のみを免疫したマウスには 13 日目までにそれぞれ 5 匹全例腫瘍が生着したが、h s p 1 0 5 -DNA エアクチンを免疫した 5 匹のうち、20 日目に 1 匹、24 日目に 1 匹腫瘍が生着したものの、残りの 3 匹は腫瘍を完全に拒絶した。アジュバント群は、24 日目までに 5 匹全例腫瘍が生着した。DNA ワクチン・ペプチドワクチン・アジュバント群と生食・ベクター群間に有意差を認めた（図 3 B）。腫瘍面積の平均においても同様の結果であった（図 3 A）。

これらの結果からペプチドワクチンおよび DNA ワクチンの抗癌剤としての効果は明らかである。全体の生存曲線でみると、生食・ベクター・アジュバント群は 45 日目でも 5 匹中 2 匹が生存しており、DNA ワクチン群に至っては、5 匹全例とも生存していた。DNA ワクチン群は他の 4 群全てとの間に有意差を認めた。ペプチドワクチン群は生食・ベクター・アジュバント群との間に有意差をもって生存期間の延長を認めた（図 3 C）。更に、腫瘍を拒絶したマウスを病理学的に観察し、正常臓器への傷害がおこっていないことと、腫瘍を拒絶した局所に炎

症細胞が多数浸潤していることを確認した。

《h s p 1 0 5 の C T L エピトープペプチドの決定》

C T L エピトープペプチドを同定するため、DNA ワクチンペプチドワクチンが有効であったマウスより脾臓細胞を回収し、表 2 に示す 9 種類のペプチドで 1 回刺激し、 ^{51}Cr release assay によって Colon-2 6 に対する細胞傷害活性を検討した。その結果、上記 9 種のペプチドの中では、下記 5 種類のペプチド 1、2、3、4、6 が有用であることを認めた (図 4)。

Asn-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu	…	(1)
Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu	…	(2)
Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile	…	(3)
Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu	…	(4)
Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile	…	(5)

《癌診断薬》

h s p 1 0 5 の抗体を用いて、肺癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、膀胱癌又は肉腫等の癌の病理診断をすることができる。

《C T L 癌治療薬》

マウスにおいて h s p 1 0 5 および／又は h s p 1 0 5 を構成するペプチドを抗原として認識するキラー T 細胞は正常細胞を傷付けず、マウス大腸癌にのみ細胞傷害活性を有することがわかった。h s p 1 0 5 は高発現するヒト肺癌・大腸癌における、副作用の少ない癌治療薬あるいは予防薬として使用することが出来る可能性がある。

実施例 4 : h s p 1 0 5 のヒトにおける HLA-A24 の C T L エピトープペプチドの同定

h s p 1 0 5 のヒトにおける HLA-A24 の C T L エピトープペプチドを決定するため、HLA-A24 の 2 人の大腸癌患者さんの末梢血リンパ球を表 3 に示す 9 種類のペプチ

ドで4回刺激し、 ^{51}Cr release assay によって、hsp105 を高発現し、かつ HLA-A24 を発現するヒト大腸癌細胞株 sw620 に対する細胞傷害活性を検討した。

具体的には、末梢血より単核球を分離し、24 穴プレート 1 ウェルあたり 200 万個の単核球を、自己の血清を 10% 含み、IL-2 (100IU/ml) さらには各ペプチド 10 μM を含む培養液 2ml 中で 1 週間培養し、1 週間毎に、毎回 1 週間かけて誘導した樹状細胞 (Dendritic cell; DC) 20 万個に該ペプチドを 10 μM でパルスして放射線照射したものをを用いて刺激することをさらに 3 回繰り返し、その 6 日後に細胞傷害活性を検討した。なお、DC として、200 万個の単核球を、GM-CSF (100ng/ml)、IL-4 (100U/ml) 存在下で 5 日間培養し、さらに TNF- α (20ng/ml) を加え 2 日間培養したものをを用いた。

また、C1RA2402 細胞に該ペプチドをのせたものをのせないものより傷害するものを、ペプチド特異性陽性と判定した。結果を表 3 に示す。表 3 の太字の数字が、ペプチド特異的かつ癌細胞傷害性の CTL が誘導できていることを示す。

hsp105-derived peptide	Position	Sequence	HLA-A2402- (HLA-A			each peptide-induced CTLs from Pt 1 (HLA-A2402/)			each peptide-induced CTLs from Pt 2 (HLA-A2402/)		
			binding score	0201/2402)		% Lysis to		% Lysis to		% Lysis to	
				240	16	C1RA2402		C1RA2402		C1RA2402	
						sw620	C1RA2402	sw620	C1RA2402	sw620	C1RA2402
				peptide 10 μ M							peptide 10 μ M
A24-1	180-188	NYGIYKQDL	240	16	42	31	32	13	25		
A24-2	214-223	AFNKGKLV	30	0	42	49	40	28	54		
A24-3	251-260	KYKLDKSKI	110	50	29	46	21	33	44		
A24-4	305-313	QFEELCAEL	48	48	22	43	16	40	38		
A24-5	433-442	TFLRRGPFEL	33	53	33	33	26	33	46		
A24-6	613-622	MYIETEGKMI	90	49	22	47	29	28	52		
A24-7	640-649	EYVYEFKDL	330	40	22	45	8	26	31		
A24-8	725-733	HYAKIAADF	140	41	25	37	66	28	43		
A24-9	739-748	KYNHIDESEM	83	19	36	43	33	24	45		

実施例 5 : hsp105 のヒトにおける HLA-A2 の CTL エピトープペプチドの同定

hsp105 のヒトにおける HLA-A2 の CTL エピトープペプチドを決定するため、HLA-A2 の 1 人の大腸癌患者さんと 1 人の健常人の末梢血リンパ球を表 4 に示す 3.0 種類のペプチドで 4 回刺激し、⁵¹Cr release assay によって、hsp105 を高発現し、かつ HLA-A2 を発現するヒト大腸癌細胞株 sw620 に対する細胞傷害活性を検討した。具体的実験方法は、実施例 4 と同様に行った。

また、sw620 細胞の hsp105 の発現を RNAi を用いて落としたものを sw620 hsp105-RNAi 細胞とし、これを傷害しないことで、hsp105 に特異的な細胞傷害活性であることを判定した。さらに、sw620 hsp105-RNAi 細胞に該ペプチドをのせたものをのせないものより傷害するものを、ペプチド特異性陽性と判定した。結果を表 4 に示す。表 4 の太字の数字が、ペプチド特異的かつ癌細胞傷害性の CTL が誘導できていることを示す。

表4 HLA-A2のヒト末梢血リンパ球を刺激することによりペプチド特異的かつ細胞傷害性キラーT細胞を誘導できるペプチド

hsp105-derived peptide	Position	Sequence	binding score	each peptide-induced CTLs from Pt 1 (HLA-A0207/3301)		each peptide-induced CTLs from HD 1 (HLA-A0201/0207)	
				% Lysis to		% Lysis to	
				sw620	hsp105-RNAI peptide 10 μ M	sw620 (HLA-A0201)	hsp105-RNAI peptide 10 μ M
A2-1	86-94	NLSYDLVPL	49	5	68	-	-
A2-2	103-111	VMYMGEEHL	41	20	41	-	-
A2-3	105-114	YMGEELFSV	12637	5	0	-	-
A2-4	120-128	MLLTKLKET	107	0	0	6	35
A2-5	141-149	VISVPSFFT	55	4	0	-	-
A2-6	155-163	SVLDAAQIV	37	5	7	4	0
A2-7	169-177	RLMNDMTAV	591	4	0	2	29
A2-8	190-199	SLDEKPRIV	46	30	18	26	9
A2-9	202-210	DMGHSAFQV	21	26	0	-	-
A2-10	222-231	VLGTAFDPFL	759	0	29	2	0
A2-11	265-273	RLYQECEKL	33	18	0	15	0
A2-12	275-284	KLMSSNSTDL	276	10	1	10	28
A2-13	276-284	LMSSNSTDL	26	11	0	11	0
A2-14	300-309	KMNRSQFEEL	50	11	0	44	61
A2-15	304-313	SQFEELCAEL	32	12	0	21	0
A2-16	313-321	LLQKIEVPL	36	10	21	-	-
A2-17	323-332	SLLEQTHLKV	1055	1	76	32	0
A2-18	381-389	AILSPAFKV	205	50	0	22	28
A2-19	434-422	FLRRGPFEL	43	8	39	-	-
A2-20	458-467	KIGRFVQNV	76	24	0	32	9
A2-21	601-610	NLVWQLGKDL	21	7	0	5	0
A2-22	602-610	LVWQLGKDL	26	19	0	-	-
A2-23	641-649	YVYFRDKL	210	26	2	0	9
A2-24	648-657	KLCGPYEKFI	200	9	0	42	0
A2-25	668-676	LLTETEDWL	401	32	0	23	42
A2-26	675-684	WLYEEGEDQA	146	18	0	11	21
A2-27	694-702	ELMKIGTPV	19	14	0	22	0
A2-28	714-723	KMFEELGQRL	819	11	2	5	0
A2-29	757-765	EVMEWMNNV	15	1	0	-	-
A2-30	765-774	VMNAQAKKSL	26	0	0	26	0

実施例 6 : 組織における hsp105 の免疫組織化学的解析結果

様々な組織における hsp105 の発現を免疫組織化学的に解析した。具体的には、様々な組織のホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックを用いて 3mm の薄切切片を作成し、VECTOR stain ABC-PO (rabbit IgG) kit (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) を用いて、ABC 法 (avidin-biotin complex immunoperoxidase technique) で免疫組織化学的解析を行った。一次抗体には、rabbit polyclonal anti-human HSP105 Ab (SANTACRUZ, Santa Cruz, CA) を購入して 200 倍に希釈して用いた。

結果を示した顕微鏡写真を図 5 に示す。図 5 においては、A : 大腸癌、B : 大腸腺腫の中の大腸癌、C : 大腸癌の肝転移、D : 膵癌、E : 膵島細胞腫、F : 乳癌の乳頭腺管癌、G : 乳癌の硬癌、H : 食道癌、I : 甲状腺癌、J : 胃悪性リンパ腫、K : 褐色細胞腫、L : 膀胱癌、M : 精巣、及び N : 精上皮腫を示す。図 5 の結果から分かるように、A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, M, N、すなわち G 以外の腫瘍ならびに精巣で hsp105 の高発現が認められた。

実施例 7 : hsp105 で誘導したマウスの CD 4 陽性ヘルパー T 細胞株の in vivo における抗腫瘍活性

BALB/c マウスの脾臓を採取し、すりつぶして脾細胞を分離し、96 穴平底プレート 1 ウェルあたり 20 万個の脾細胞を、IL-2 (100IU/ml) さらにはリコンビナント hsp105 蛋白 $2 \mu\text{g/ml}$ を含む培養液 $200 \mu\text{l}$ 中で 1 週間培養し、1 週間毎に、毎回脾細胞 20 万個にリコンビナント hsp105 蛋白を $2 \mu\text{g/ml}$ でパルスして放射線照射したものをを用いて刺激することをさらに何回も繰り返し、複数の CD4 陽性ヘルパー T 細胞株 (Th) を樹立した。細胞表面の CD4、CD8 の発現の確認は、Monoclonal Antibody MOUSE CD4-FITC, CD8-FITC (IMMUNOTECH, Marseille, France) を用いて免疫蛍光染色を行い、FACS にて解析した (図 6 の A)。Th が hsp105 蛋白に特異的に反応して増殖するかどうかを [^3H] thymidine の取り込みで調べた。具体的には、96 穴平底プレート 1 ウェルあたり 15 万個の脾細胞を入れ、hsp105 蛋白を一晩パルス

したものとし、しないものを用意し、それぞれに対し、3万個のThを入れ、72時間反応させた（最後の16時間に1ウェルあたり1 μ Ciの ^3H thymidineを入れた）。そして、 ^3H thymidineの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。そのThはhsp105蛋白に特異的に反応して増殖した（図6のB）。また、この際、Thを入れて24時間後の上清をとっておき、Mouse IFN- γ , IL-4 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) を用いて、Thが反応して分泌したIFN- γ とIL-4を測定した。そのThはhsp105蛋白に特異的に反応してIFN- γ を大量に産生するTh1タイプであった。（図6のC）。BALB/cマウスの背部皮下にColon 26を移植し、3mm大の腫瘍を形成した後に、そのThを局注して経過を観察した結果、治療後は、明らかにColon 26腫瘍塊の増殖を遅らせた（図6のD）。

以上の結果から、hsp105蛋白で誘導したBALB/cマウスのCD4陽性ヘルパーT細胞株は、hsp105蛋白特異的に増殖し、hsp105を高発現する大腸癌細胞株Colon26腫瘍塊の増殖を遅らせることが示された。

実施例8：hsp105で誘導した大腸癌患者のCD4陽性ヘルパーT細胞株

末梢血より単核球を分離し、96穴平底プレート1ウェルあたり20万個の単核球を、IL-2 (100IU/ml)さらにはリコンビナントhsp105蛋白2 μ g/mlを含む培養液200 μ l中で1週間培養し、1週間毎に、毎回単核球20万個にリコンビナントhsp105蛋白を2 μ g/mlでパルスして放射線照射したものを用いて刺激することをさらに何回も繰り返し、複数のCD4陽性ヘルパーT細胞株(Th)を樹立した。細胞表面のCD4、CD8の発現の確認は、ファージンゲン抗ヒトCD4、CD8-FITCを用いて免疫蛍光染色を行い、FACSにて解析した。Thがhsp105蛋白に特異的に反応して増殖するかどうかは実施例7と同様に行った。そのThはhsp105蛋白に特異的に反応して増殖した。（図7のA）。また、実施例7と同様に、Human IFN- γ , IL-4 US ELISA Kit (BIOSOURCE, Camarillo, CA)を用いて、Thが反応して分泌したIFN- γ とIL-4を測定した。そのThはhsp105蛋白に特異的に反応してIFN- γ を大量に産生するTh1タイプであった。（図7のB）。一般的に、Th1はCTLの誘導およ

び抗腫瘍免疫に有利な方に働くことが知られており、ヒトにおいても、末梢血リンパ球を hsp105 蛋白で刺激することで、このような Th1 が誘導できることが示された。

実施例 9 : hsp105 ペプチドで刺激した細胞傷害性 T 細胞の in vivo における抗腫瘍活性

hsp105 由来ペプチド Asn-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu (配列番号 3) で誘導した BALB/c マウスの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、hsp105 を高発現する大腸癌細胞株 Colon26 腫瘍塊を縮小させるかどうかを調べた。具体的には、BALB/c マウスの背部皮下に Colon26 を移植し、5mm 大の腫瘍を形成した後、CTL を局注して 1 週間後に解剖して、HE 染色により病理学的に観察した。結果を図 8 に示す。図 8 の結果から分かるように、hsp105 由来ペプチドで誘導した CTL の投与により、腫瘍は明らかに縮小した。

さらに、hsp105 由来ペプチド Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Asn-Ser-Thr-Asp-Leu (配列番号 14) で誘導した大腸癌患者の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、hsp105 を高発現する大腸癌細胞株 sw620 腫瘍塊を縮小させるかどうかを調べた。具体的には、ヌードマウスの背部皮下に sw620 を移植し、5mm 大の腫瘍を形成した後、CTL を局注した。

CTL の局注から 1 週間後には、腫瘍は縮小した。治療して 2 週間後に解剖して、HE 染色により病理学的に観察した。結果を図 9 に示す。図 9 の結果から分かるように、CTL の投与により、腫瘍の増大を明らかに遅らせることができた。

産業上の利用の可能性

本発明の癌抗原蛋白、および抗原ペプチド、あるいは本発明の蛋白またはペプチドをコードする DNA は自己傷害性等の副作用が少なく優れた抗癌ワクチンとして使用することが出来る。また、抗体は診断薬として使用することができる。また本発明の抗原により刺激、活性化されたヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、

又はこれらを含む免疫細胞集団は抗癌剤として使用できる。

請求の範囲

1. 下記（A）又は（B）の何れかの蛋白質から成る癌抗原。
（A）配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。
（B）配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質。
2. 請求項 1 に記載の癌抗原を含む、癌に対する免疫誘導剤。
3. 請求項 1 に記載の癌抗原の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド。
4. 癌抗原蛋白質を認識する細胞傷害性 T 細胞を活性化しうる、請求項 3 に記載のペプチド。
5. 配列番号 3 ～ 22 の何れかに記載のアミノ酸配列を有する、請求項 3 又は 4 に記載のペプチド。
6. 配列番号 3 ～ 22 の何れかに記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有するペプチド。
7. 癌抗原蛋白質を認識する細胞傷害性 T 細胞を活性化しうる、請求項 6 に記載のペプチド。
8. 請求項 3 から 7 の何れかに記載のペプチドを含む、癌に対する免疫誘導剤。
9. 請求項 1 に記載の癌抗原をコードする DNA。
10. 下記（a）、（b）又は（c）の何れかの DNA。
（a）配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA。
（b）配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードする DNA。
（c）上記（a）又は（b）の DNA の部分配列を有し、かつ、免疫誘導活性を

有する蛋白質をコードするDNA。

11. 請求項1記載の癌抗原又は請求項3から7の何れかに記載のペプチドに対する抗体。

12. 請求項1記載の癌抗原、又は請求項3から7の何れかに記載のペプチド、又はそれらの混合物を用いてインビトロ刺激により誘導されたヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団。

13. 請求項1記載の癌抗原、又は請求項3から7の何れかに記載のペプチド、又はそれらの混合物と、免疫賦活剤とを用いてインビトロ刺激により誘導されたヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団。

14. 免疫賦活剤が細胞増殖因子又はサイトカインである、請求項13に記載のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団。

15. 請求項12から14の何れかに記載のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を体内に移入することを含む、腫瘍を抑制する方法。

16. 癌を予防及び／又は治療するための、請求項15に記載の方法。

17. 請求項1記載の癌抗原、又は請求項3から7の何れかに記載のペプチド、又はそれらの混合物を含む、請求項12から14の何れかに記載のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製するための細胞培養液。

18. 請求項17に記載の細胞培養液、及び細胞培養容器を含む、請求項12から14の何れかに記載のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を作製するための細胞培養キット。

19. 請求項1記載の癌抗原、及び／又は請求項3から7の何れかに記載の少なくとも1種類以上のペプチドを含む癌ワクチン。

20. アジュバンドをさらに含む請求項19に記載の癌ワクチン。

21. 請求項9又は10に記載のDNA、又は該DNAを含む組換えウイルス若しくは組換え細菌を含む、癌ワクチン。

22. アジュバンドをさらに含む請求項21に記載の癌ワクチン。
23. 請求項9又は10に記載のDNAを含む、癌診断用プローブ。
24. 請求項23に記載の癌診断用プローブ及び／又は請求項11に記載の抗体を含む、癌診断薬。
25. 請求項1に記載の癌抗原、請求項3から7の何れかに記載のペプチド、請求項11に記載の抗体、及び／又は請求項12から14の何れかに記載のヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、又はこれらを含む免疫細胞集団を含む、癌の予防・治療薬。
26. 癌が膀胱癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、膀胱癌又は肉腫である、請求項23から25の何れかに記載のプローブ又は薬剤。

☒ 1

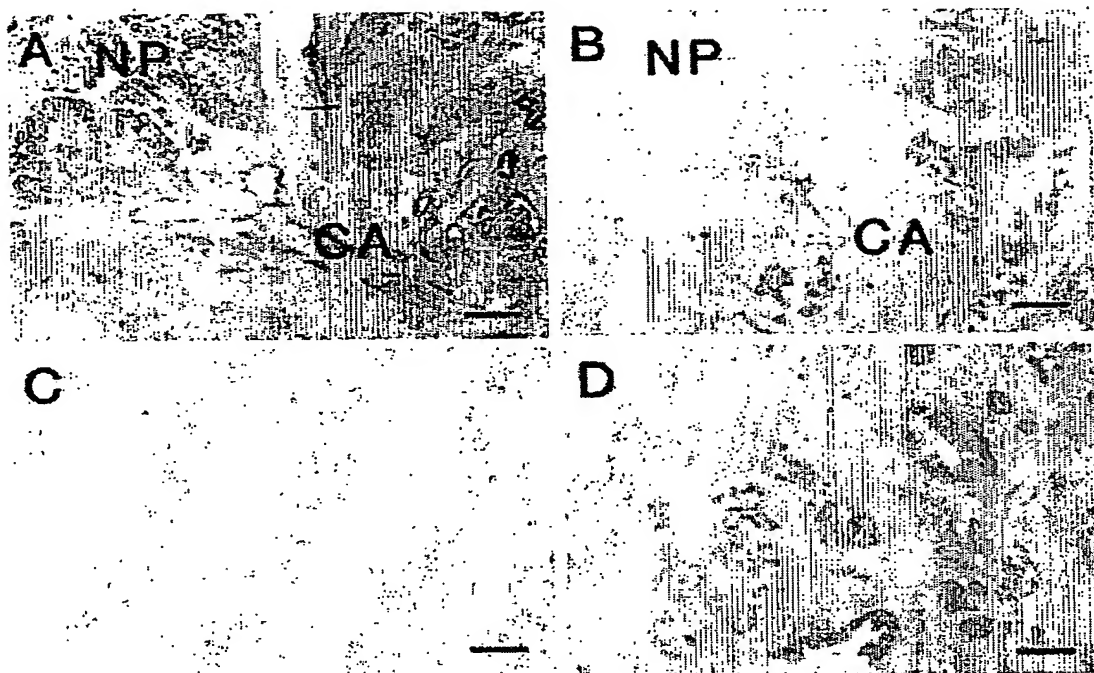


図 2

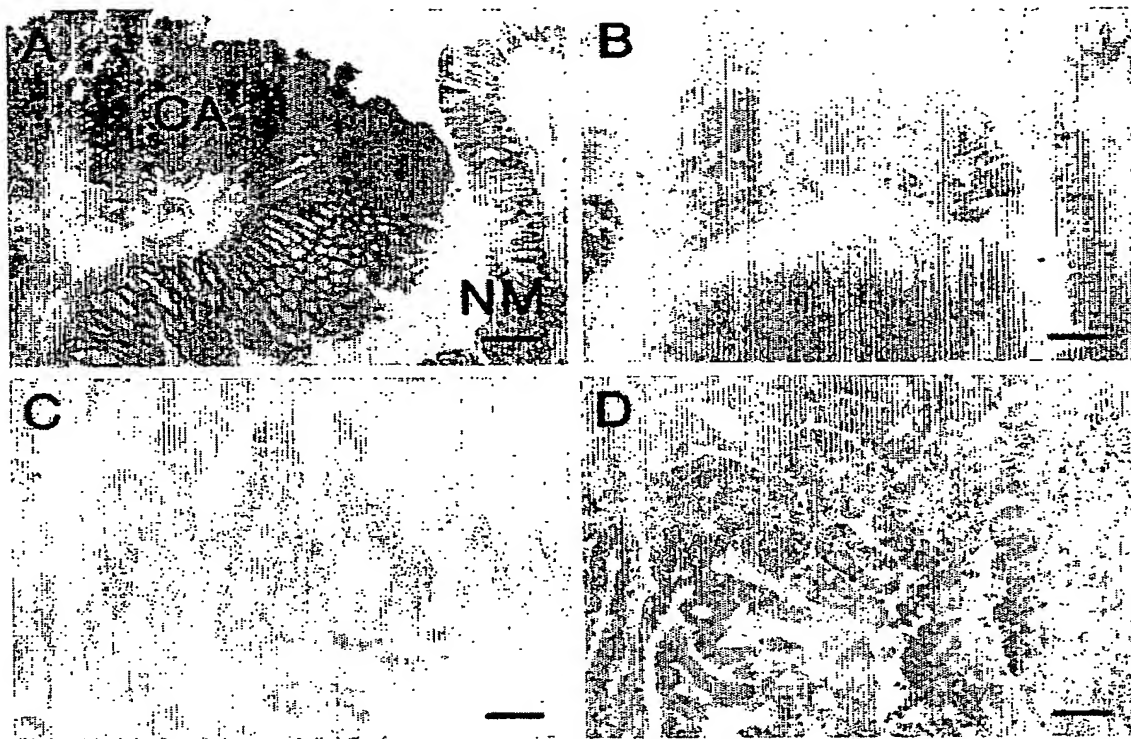


図 3

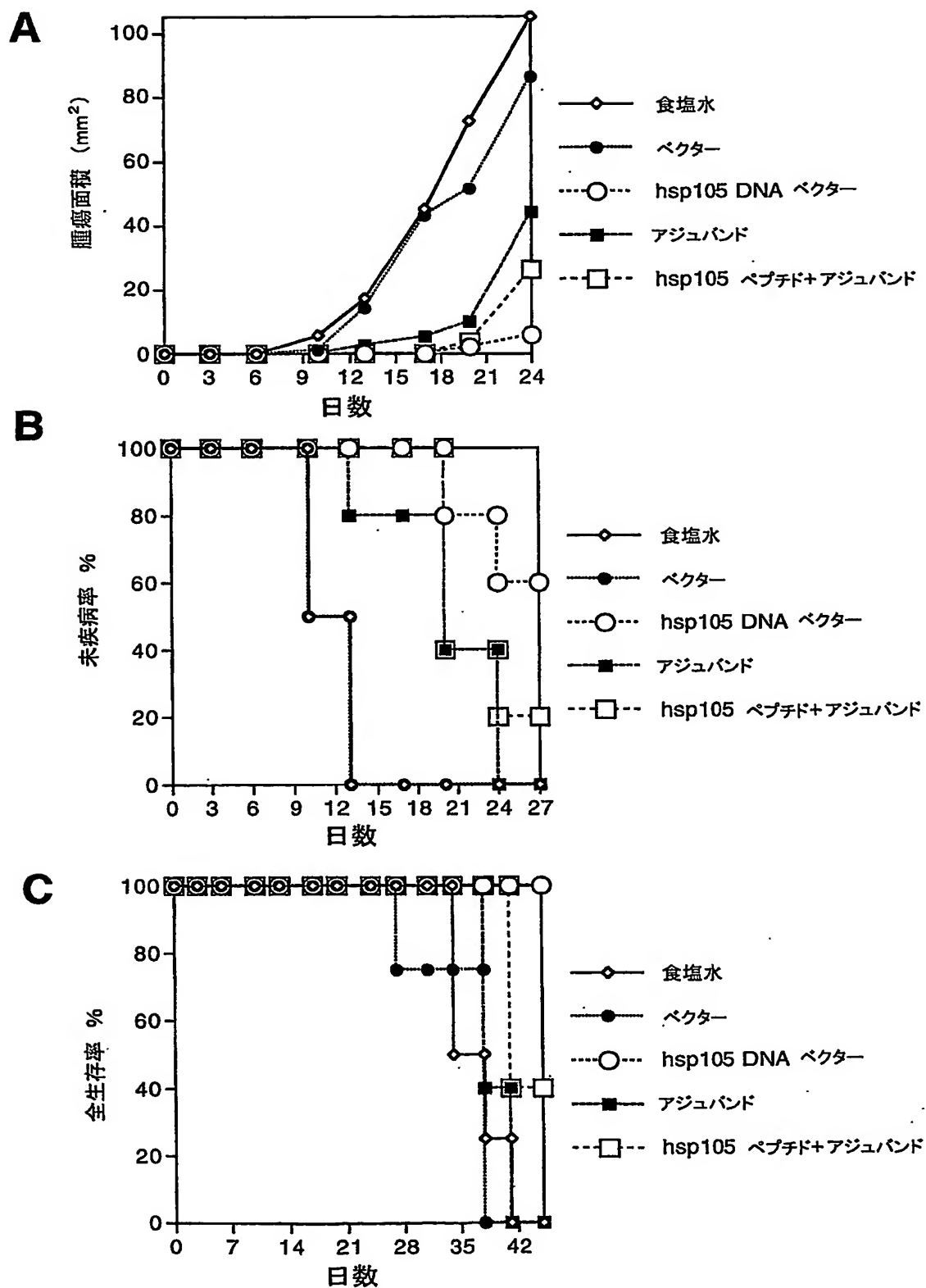


図 4

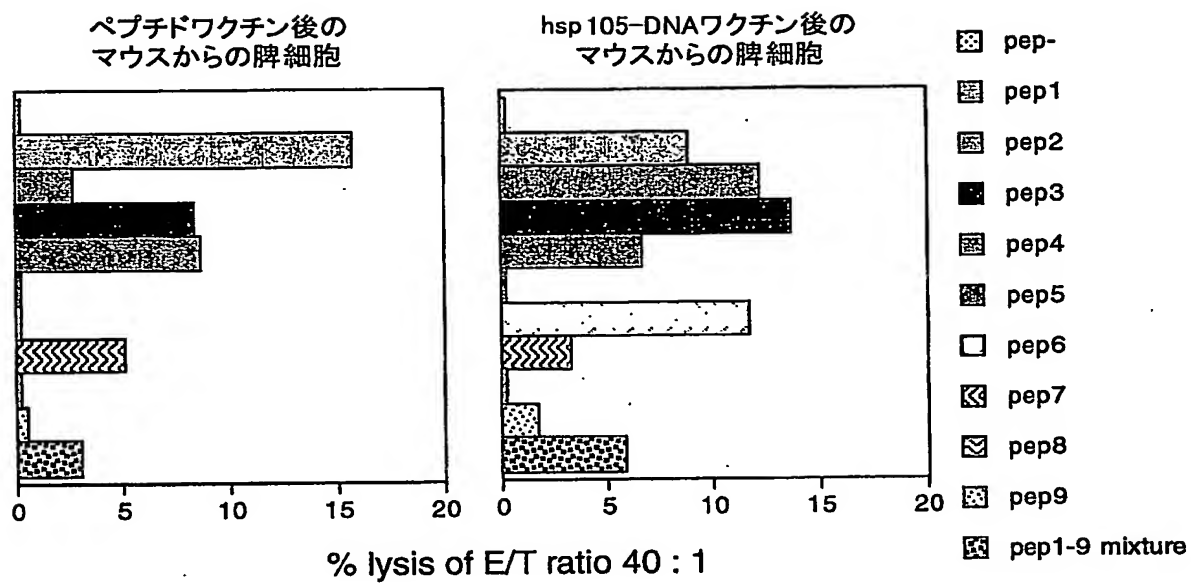


图 5

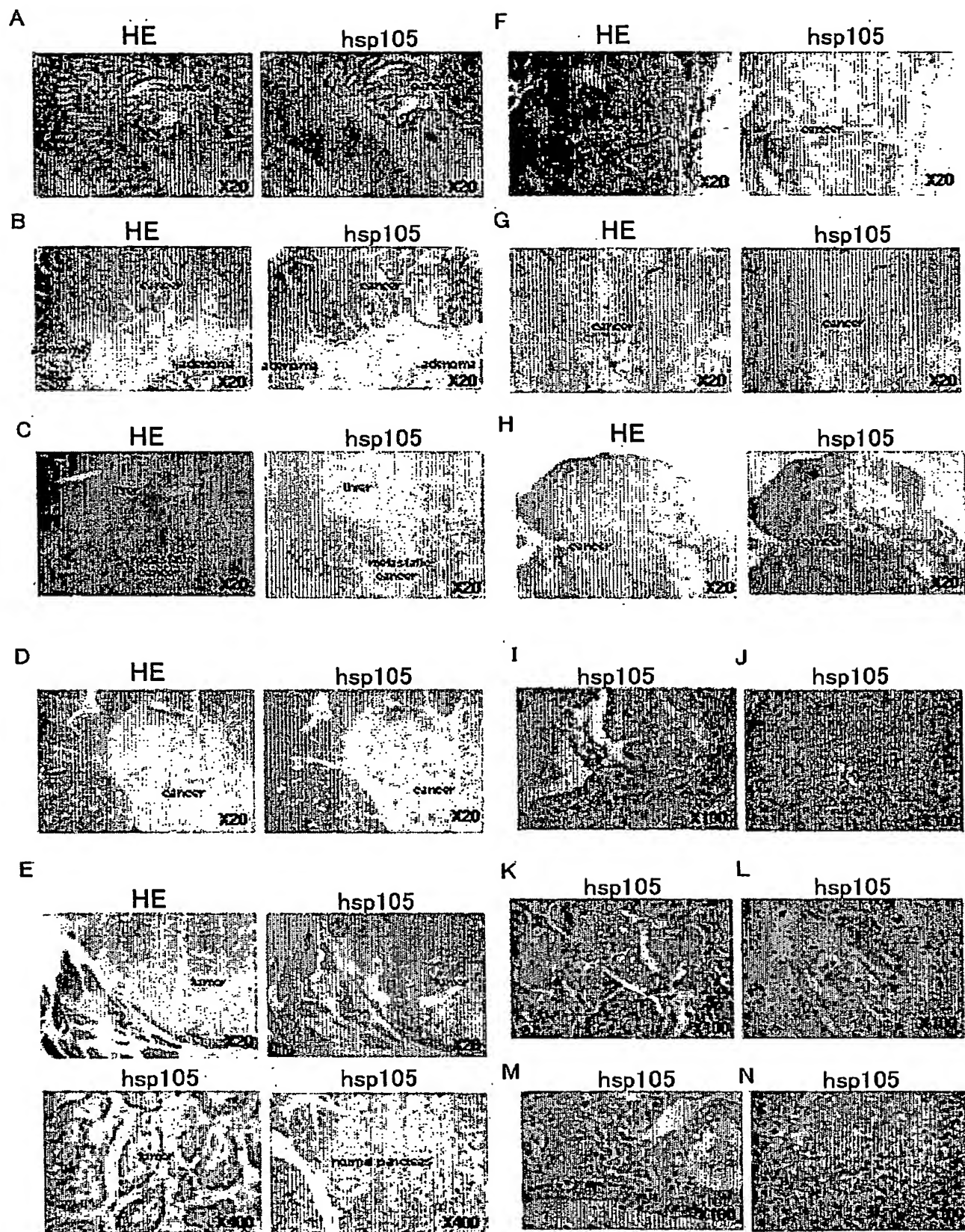
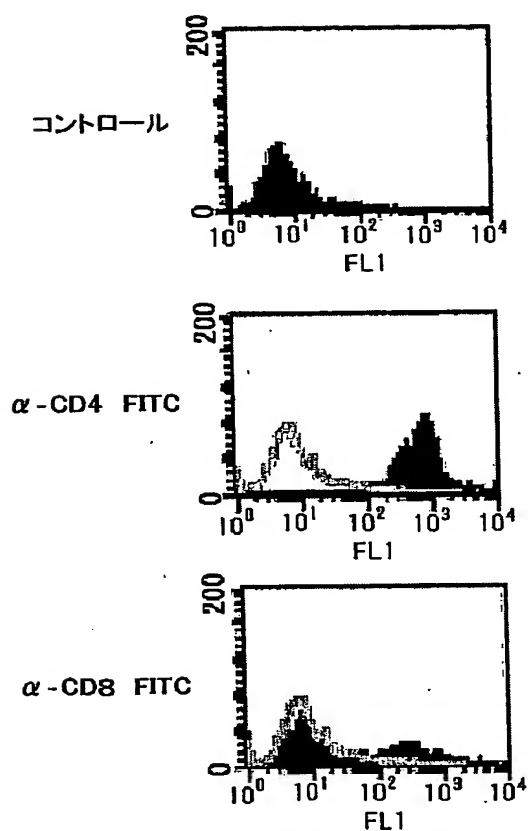
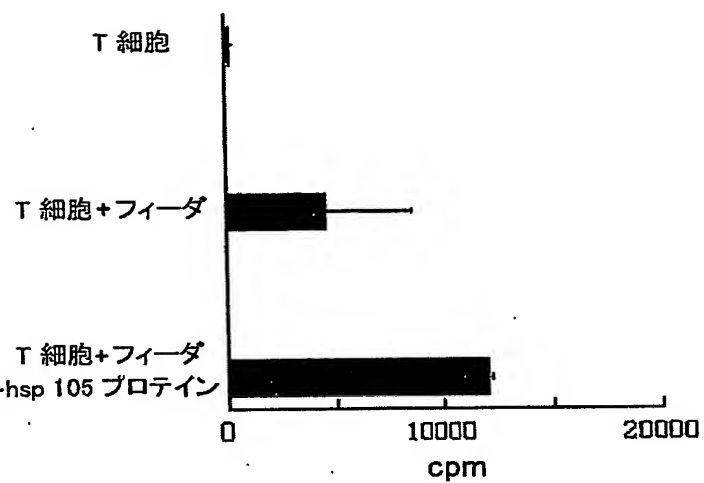


図 6

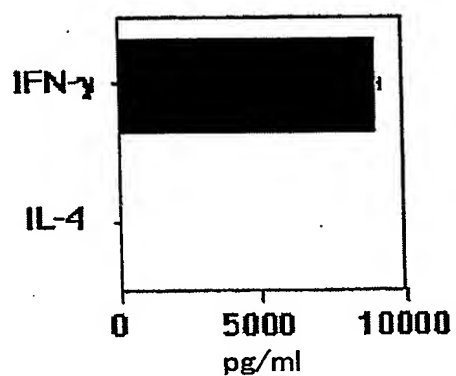
A



B



C



D

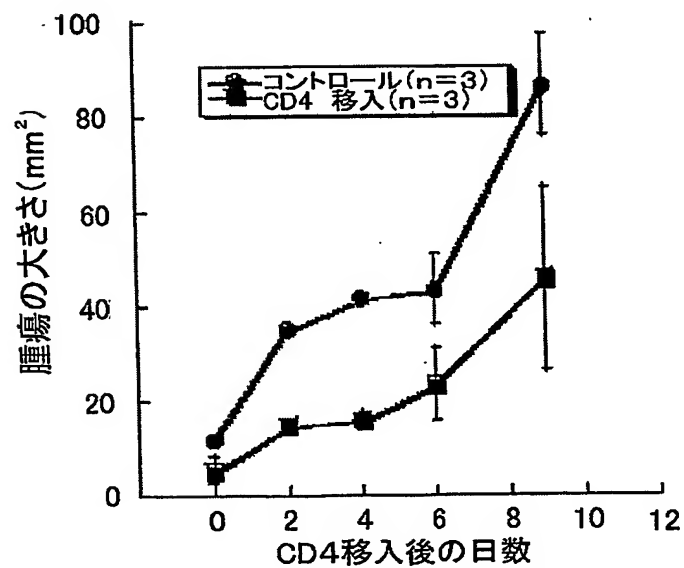


図 7

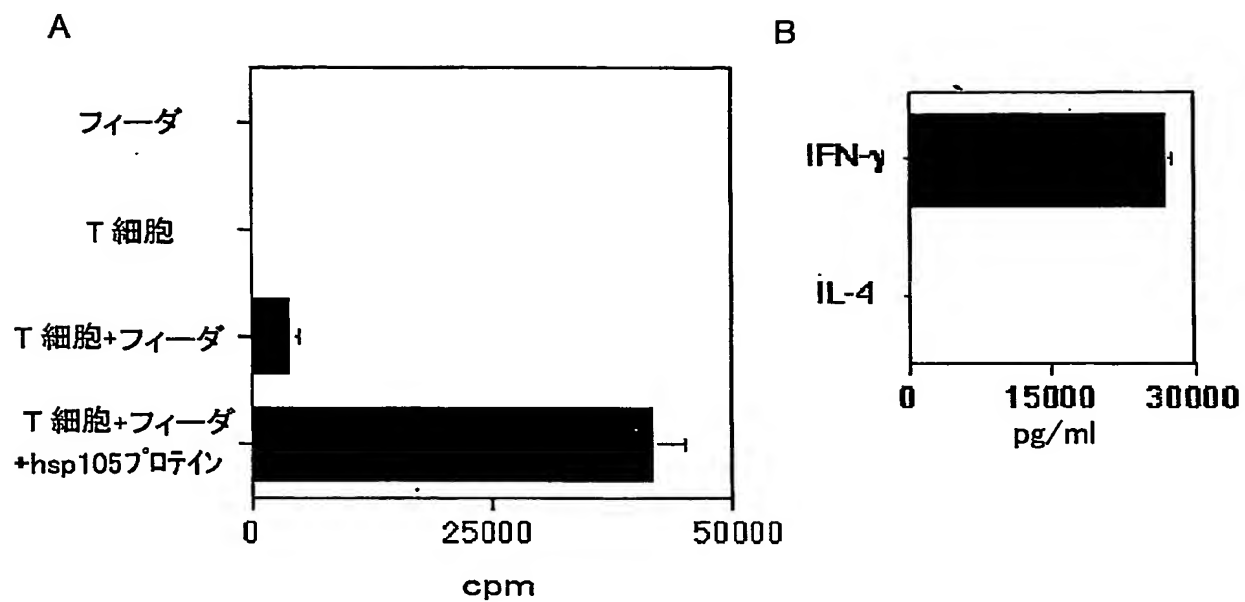


図 8

CTL-処置

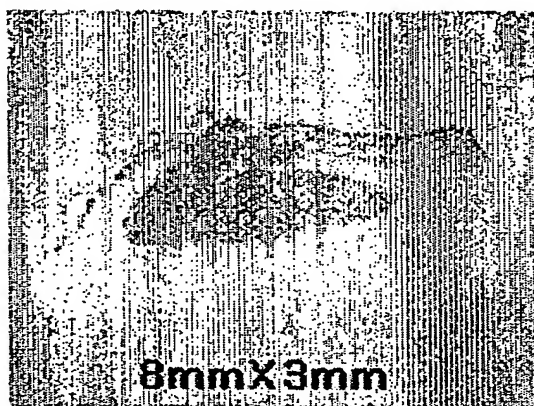
未処置



図 9

CTL-処置

未処置



SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology and Industry Fundation

<120> Cancer antigen and its use

<130> A31533A

<160> 22

<210> 1

<211> 858

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met Ser Val Val Gly Leu Asp Val Gly Ser Gln Ser Cys Tyr Ile Ala

1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Phe Ser Asp

20 25 30

Arg Cys Thr Pro Ser Val Ile Ser Phe Gly Ser Lys Asn Arg Thr Ile

35 40 45

Gly Val Ala Ala Lys Asn Gln Gln Ile Thr His Ala Asn Asn Thr Val

50 55 60

Ser Asn Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Asn Asp Pro Phe Ile

65 70 75 80

Gln Lys Glu Lys Glu Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu Lys Asn

85 90 95

Gly Gly Val Gly Ile Lys Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe

100 105 110

Ser Val Glu Gln Ile Thr Ala Met Leu Leu Thr Lys Leu Lys Glu Thr

115 120 125

Ala Glu Asn Ser Leu Lys Lys Pro Val Thr Asp Cys Val Ile Ser Val
130 135 140
Pro Ser Phe Phe Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Leu Asp Ala Ala
145 150 155 160
Gln Ile Val Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Asp Met Thr Ala
165 170 175
Val Ala Leu Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Ser Leu Asp
180 185 190
Glu Lys Pro Arg Ile Val Val Phe Val Asp Met Gly His Ser Ala Phe
195 200 205
Gln Val Ser Ala Cys Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu Gly
210 215 220
Thr Ala Phe Asp Pro Phe Leu Gly Gly Lys Asn Phe Asp Glu Lys Leu
225 230 235 240
Val Glu His Phe Cys Ala Glu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Leu Asp Ala
245 250 255
Lys Ser Lys Ile Arg Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys
260 265 270
Leu Lys Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu Pro Leu Asn Ile
275 280 285
Glu Cys Phe Met Asn Asp Lys Asp Val Ser Gly Lys Met Asn Arg Ser
290 295 300
Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu Leu Gln Lys Ile Glu Val Pro
305 310 315 320
Leu Tyr Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val Glu Asp Val Ser
325 330 335
Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu

340 345 350
Arg Ile Ala Lys Phe Phe Gly Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala
355 360 365
Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser
370 375 380
Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Val Thr Asp Ala Val Pro Phe
385 390 395 400
Pro Ile Ser Leu Ile Trp Asn His Asp Ser Glu Asp Thr Glu Gly Val
405 410 415
His Glu Val Phe Ser Arg Asn His Ala Ala Pro Phe Ser Lys Val Leu
420 425 430
Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu Glu Ala Phe Tyr Ser Asp
435 440 445
Pro Gln Gly Val Pro Tyr Pro Glu Ala Lys Ile Gly Arg Phe Val Val
450 455 460
Gln Asn Val Ser Ala Gln Lys Asp Gly Glu Lys Ser Arg Val Lys Val
465 470 475 480
Lys Val Arg Val Asn Thr His Gly Ile Phe Thr Ile Ser Thr Ala Ser
485 490 495
Met Val Glu Lys Val Pro Thr Glu Glu Asn Glu Met Ser Ser Glu Ala
500 505 510
Asp Met Glu Cys Leu Asn Gln Arg Pro Pro Glu Asn Pro Asp Thr Asp
515 520 525
Lys Asn Val Gln Gln Asp Asn Ser Glu Ala Gly Thr Gln Pro Gln Val
530 535 540
Gln Thr Asp Ala Gln Gln Thr Ser Gln Ser Pro Pro Ser Pro Glu Leu
545 550 555 560

Thr Ser Glu Glu Asn Lys Ile Pro Asp Ala Asp Lys Ala Asn Glu Lys
565 570 575

Lys Val Asp Gln Pro Pro Glu Ala Lys Lys Pro Lys Ile Lys Val Val
580 585 590

Asn Val Glu Leu Pro Ile Glu Ala Asn Leu Val Trp Gln Leu Gly Lys
595 600 605

Asp Leu Leu Asn Met Tyr Ile Glu Thr Glu Gly Lys Met Ile Met Gln
610 615 620

Asp Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp Ala Lys Asn Ala Val Glu Glu
625 630 635 640

Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu Cys Gly Pro Tyr Glu Lys Phe
645 650 655

Ile Cys Glu Gln Asp His Gln Asn Phe Leu Arg Leu Leu Thr Glu Thr
660 665 670

Glu Asp Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu Asp Gln Ala Lys Gln Ala Tyr
675 680 685

Val Asp Lys Leu Glu Glu Leu Met Lys Ile Gly Thr Pro Val Lys Val
690 695 700

Arg Phe Gln Glu Ala Glu Glu Arg Pro Lys Met Phe Glu Glu Leu Gly
705 710 715 720

Gln Arg Leu Gln His Tyr Ala Lys Ile Ala Ala Asp Phe Arg Asn Lys
725 730 735

Asp Glu Lys Tyr Asn His Ile Asp Glu Ser Glu Met Lys Lys Val Glu
740 745 750

Lys Ser Val Asn Glu Val Met Glu Trp Met Asn Asn Val Met Asn Ala
755 760 765

Gln Ala Lys Lys Ser Leu Asp Gln Asp Pro Val Val Arg Ala Gln Glu

770	775	780
Ile Lys Thr Lys Ile Lys Glu Leu Asn Asn Thr Cys Glu Pro Val Val		
785	790	795
Thr Gln Pro Lys Pro Lys Ile Glu Ser Pro Lys Leu Glu Arg Thr Pro		800
	805	810
Asn Gly Pro Asn Ile Asp Lys Lys Glu Glu Asp Leu Glu Asp Lys Asn		815
	820	825
Asn Phe Gly Ala Glu Pro Pro His Gln Asn Gly Glu Cys Tyr Pro Asn		830
	835	840
Glu Lys Asn Ser Val Asn Met Asp Leu Asp		845
	850	855

<210> 2

<211> 3612

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

gaggaagtgg gacctccct tttgggtcgg tagttcagcg ccggcgccgg tgtgagagcc 60
gcggcagagt gaggcaggca acccgaggtg cggagcgacc tgcggaggct gagccccgct 120
ttctcccagg gtttcttate agccagccgc cgctgtcccc gggggagtag gaggtcctg 180
acaggccgcg gctgtctgtg tgtccttctg agtgtcagag gaacggccag accccgcggg 240
ccggagcaga acgcggccag ggcagaaagc ggccggcagga gaagcaggca gggggccgga 300
ggacgcagac cgagaccga ggcggaggcg gaccgcgagc cggccatgtc ggtggtgggg 360
ttggacgtgg gctgcagag ctgctacatc gcggtagccc gggccggggg catcgagacc 420
atcgccaatg agttcagcga ccggtgcacc ccgtcagtca tatcatttgg atcaaaaaat 480
agaacaatcg gagttgcagc caaaaatcag caaatcactc atgcaaaca tacggtgtct 540
aacttcaaaa gatttcatgg ccgagcattc aacgaccct tcattcaaaa ggagaaggaa 600

```

aacttgagtt acgatttggt tccattgaaa aatggtggag ttggaataaa ggtaatgtac 660
atgggtgaag aacatctatt tagtgtggag cagataacag ccatgttggt gactaagctg 720
aaggaaactg ctgaaaacag cctcaagaaa ccagtaacag attgtgttat ttcagtcccc 780
tccttcttta cagatgctga gaggcgatct gtgttagatg ctgcacagat tgttggccta 840
aactgtttta gacttatgaa tgacatgaca gctgttgctt tgaattacgg aatttataag 900
caggatctcc caagcctgga tgagaaacct cggatagtgg tttttgttga tatgggacat 960
tcagcttttc aagtgtctgc ttgtgctttt aacaaggga aattgaaggt actgggaaca 1020
gcttttgatc ctttcttagg aggaaaaaac ttcgatgaaa agttagtggg acatttctgt 1080
gcagaattta aaactaagta caagttggat gcaaaatcca aaatacgagc actcctacgt 1140
ctgtatcagg aatgtgaaaa actgaaaaag ctaatgagct ctaacagcac agacctcca 1200
ctgaatatcg aatgctttat gaatgataaa gatgtttccg gaaagatgaa caggtcacaa 1260
tttgaagaac tctgtgctga acttctgcaa aagatagaag tacccttta ttcactgttg 1320
gaacaaactc atctcaaagt agaagatgtg agtgcagttg agattgttg aggcgctaca 1380
cgaattccag ctgtgaagga aagaattgcc aaattctttg gaaaagatat tagcacaaca 1440
ctcaatgcag atgaagcagt agccagagga tgtgcattac agtgtgcaat actttccccg 1500
gcatttaaag ttagagaatt ttccgtcaca gatgcagttc cttttccaat atctctgac 1560
tggaaccatg attcagaaga tactgaaggt gttcatgaag tcttttagtcg aaaccatgct 1620
gctcctttct ccaaagttct cacctttctg agaagggggc cttttgagct agaagctttc 1680
tattctgac cccaaggagt tccatatcca gaagcaaaaa taggccgctt tgtagttcag 1740
aatgtttctg cacagaaaga tggagaaaaa tctagagtaa aagtcaaagt gcgagtcaac 1800
acctatggca ttttcacat ctctacggca tctatgggtg agaaagtccc aactgaggag 1860
aatgaaatgt cttctgaagc tgacatggag tgtctgaatc agagaccacc agaaaacca 1920
gacactgata aaaatgtcca gcaagacaac agtgaagctg gaacacagcc ccaggtacaa 1980
actgatgctc aacaaacctc acagtctccc cttcacctg aacttacctc agaagaaaac 2040
aaaatcccag atgctgacaa agcaaatgaa aaaaaagttg accagcctcc agaagctaaa 2100
aagcccaaaa taaaggtggt gaatgttgag ctgcctattg aagccaactt ggtctggcag 2160
ttagggaaag accttcttaa catgtatatt gagacagagg gtaagatgat aatgcaagat 2220

aaattggaaa aagaaaggaa tgatgctaaa aatgcagttg aggaatatgt gtatgagttc 2280
agagacaagc tgtgtggacc atatgaaaaa tttatatgtg agcaggatca tcaaaatttt 2340
ttgagactcc tcacagaaac tgaagactgg ctgtatgaag aaggagagga ccaagctaaa 2400
caagcatatg ttgacaagtt ggaagaatta atgaaaattg gcactccagt taaagttcgg 2460
tttcaggaag ctgaagaacg gccaaaaatg tttgaagaac taggacagag gctgcagcat 2520
tatgccaaga tagcagctga cttcagaaat aaggatgaga aatacaacca tattgatgag 2580
tctgaaatga aaaaagtgga gaagtctgtt aatgaagtga tggaatggat gaataatgtc 2640
atgaatgctc aggctaaaaa gagtcttgat caggatccag ttgtacgtgc tcaggaaatt 2700
aaaacaaaaa tcaaggaatt gaacaacaca tgtgaaccgc ttgtaacaca accgaaacca 2760
aaaattgaat cacccaaact ggaaagaact ccaaattggc caaatattga taaaaaggaa 2820
gaagatttag aagacaaaaa caatttttgt gctgaacctc cacatcagaa tggatgaatgt 2880
taccctaatt agaaaaattc tgtaaatatg gacttggact agataacctt aaattggcct 2940
attccttcaa ttaataaaat atttttgcca tagtatgtga ctctacataa catactgaaa 3000
ctatttatat tttctttttt aaggatatat agaaattttg tgtattatat ggaaaaagaa 3060
aaaaagctta agtctgtagt ctttatgatc ctaaaaggga aaattgcctt ggtaactttc 3120
agattcctgt ggaattgtga attcactact agctttctgt gcagtctcac catttgcac 3180
actgaggatg aaactgactt ttgtcttttg gagaaaaaaa actgtactgt tgttcaagag 3240
ggctgtgatt aaaatcttta agcatttggt cctgccaaagg tagttttctt gcattttgct 3300
ctccattcag catgtgtgtg ggtgtggatg tttataaaca agactaagtc tgacttcata 3360
agggttttct aaaaccattt ctgtccaaga gaaaatgact ttttgctttg atattaaaaa 3420
ttcaatgagt aaaacaaaag ctagtcaaat gtgttagcag catgcagaac aaaaacttta 3480
aactttctct ctactatac agtatattgt caatgtgaaa gtgtggaatg gaagaaatgt 3540
cgatcctgtt gtaactgatt gtgaacactt ttatgagctt taaaataaag ttcattttat 3600
ggtgtcattt t 3612

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3

Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu

1

5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4

Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu

1

5

10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5

Lys Tyr Lys Leu Asp Ala Lys Ser Lys Ile

1

5

10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6

Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu

1

5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7

Met Tyr Ile Glu Thr Glu Gly Lys Met Ile

1

5

10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8

Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 9

Glu Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10

His Tyr Ala Lys Ile Ala Ala Asp Phe

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Lys Tyr Asn His Ile Asp Glu Ser Glu Met

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Ser Leu Asp Glu Lys Pro Arg Ile Val Val

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys Leu

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 14

Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu

1

5

10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15

Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu

1

5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 16

Ser Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17

Lys Ile Gly Arg Phe Val Val Gln Asn Val

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18

Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 19

Leu Leu Thr Glu Thr Glu Asp Trp Leu

1

5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 20

Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu Asp Gln Ala

1

5

10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 21

Glu Leu Met Lys Ile Gly Thr Pro Val

1

5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22

Val Met Asn Ala Gln Ala Lys Lys Ser Leu

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K14/82, C07K16/32,
C12N5/06, G01N33/53, G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K14/82, C07K16/32,
C12N5/06, G01N33/53, G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (SNT), BIOSIS (STN), WPIDS (STN),
DDBJ/GenBank/EMBL/PDB/GeneSeq/SwissProt/PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/04265 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH), 28 January, 1999 (28.01.99), Identification Nos. 582, 583 & EP 996857 A2 & US 6043084 A & JP 2001-516009 A	1-14, 17-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 September, 2003 (19.09.03)

Date of mailing of the international search report
07 October, 2003 (07.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11049

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15, 16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 15, 16 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K14/82, C07K16/32, C12N5/06, G01N33/53, G01N33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K14/82, C07K16/32, C12N5/06, G01N33/53, G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)
 DDBJ/GenBank/EMBL/PDB/GeneSeq/SwissProt/PIR

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/04265 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 1999. 01. 28 (識別番号582, 583参照) & EP 996857 A2 & US 6043084 A & JP 2001-516009 A	1-14, 17-26

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 03

国際調査報告の発送日

07.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典



4B 9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。